## PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/11, 15/55, 9/22, A61K 31/70

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/05770

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

12. Februar 1998 (12.02.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE97/01691

**A2** 

(22) Internationales Anmeldedatum: 5. August 1997 (05.08.97)

(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,

PT, SE).

(30) Prioritätsdaten:

196 31 919.6

7. August 1996 (07.08.96)

DE

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WERNER, Dieter [DE/DE]; Neuer Weg 22, D-69118 Heidelberg (DE). GRANZOW, Christof [DE/DE]; Angelweg 16, D-69121 Heidelberg (DE). JOSWIG, Gaby [DE/DE]; Max-Josef-Strasse 21, D-68167 Mannheim (DE). ROTHBARTH, Karsten [DE/DE]; Im Brunnel 20, D-69493 Dossenheim (DE). SCHUBERT, Marie [DE/DE]; Husarenstrasse 16, D-69121 Heidelberg (DE).
- (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).
- (54) Title: ANTISENSE RNA WITH A SECONDARY STRUCTURE
- (54) Bezeichnung: ANTI-SINN-RNA MIT SEKUNDÄRSTRUKTUR
- (57) Abstract

An antisense RNA with special secondary structures is disclosed, as well as a combination of the antisense RNA and of a (ds)RNAse. The antisense RNA and its combination may be used to inhibit gene expression.

#### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen sowie eine Kombination umfassend die Anti-Sinn-RNA und eine (ds)RNAse. Die Anti-Sinn-RNA und die Kombination können zur Hemmung der Genexpression verwendet werden.

## LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

		ES	Spenien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AL	Albanien	ri Pi	Finaland	LT	Litauen	SK	Slowakci
AM	Armenien		Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AT	Osterreich	FR		LV	Lettland	SZ	Swesiland
ΑÜ	Australien	GA	Gabun	MC	Monaco	TD	Tschad .
AZ	Aserbaidechan	GB	Vereinigtes Königreich	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MG	Madagaskur	TJ	Tadachikistan
BB	Barbados	GH	Ghana	MK	Die chemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BE	Belgien	GN	Guinea	IN Se	Republik Mazedonien	TR	Tirkei
BF	Barkina Paso	GR	Griechenland	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BG	Bulgarien	HU	Ungam	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BJ	Besin	ſΕ	trland	MIR	Mauretanien	UG	Uganda
BR	Brasilies	[L	Israel	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
BY	Belarus	IS.	Island	MX	Mexiko		Amerika
CA	Kanada	IT	ftalien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Nige: Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
СН	Schweiz	KG	Kirgisistan		Neusceland	zw	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Polen		
CM	Kamerun		Korea	PL			
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal Ruminien		
CU	Knba	KZ	Kasachstan	RO	Russische Föderstion		
cz	Tachechische Republik	LC	St. Lucia	RU			
DE	Deutschland	u	Liechtenstein	SD	Sudan Schweden		
DK	Dinemark	LK	Sri Lanka	SE	••••		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

WO 98/05770 PCT/DE97/01691

#### Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur, eine sie enthaltende Kombination sowie die Verwendung beider.

Neue Techniken zur Hemmung der Genexpression umfassen häufig den Einsatz von Anti-Sinn-RNA. Dies ist eine RNA, die zu Bereichen der mRNA eines Gens komplementär ist und an diese bindet. Es entsteht ein Duplexmolekül, das der Translation der mRNA entzogen ist. Damit kann eine Hemmung der Genexpression erreicht werden.

5

15

20

25

Es hat sich allerdings gezeigt, daß das Duplexmolekül häufig nicht stabil ist, d.h. die mRNA wird wieder frei für die Translation, wodurch die Hemmung der Genexpression schwach ist oder gar nicht eintritt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem eine starke Hemmung der Genexpression erzielt werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch eine Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen erreicht.

Mit dem Ausdruck "besonderer Sekundärdruck" ist gemeint, daß es sich nicht um eine natürlich vorkommende Sekundärstruktur handelt, sondern daß diese künstlich erzeugt worden ist.

Der Ausdruck "Anti-Sinn-RNA" umfaßt jegliches RNA-Molekül, das sich als Anti-Sinn-RNA eignet, d.h. komplementär zu Bereichen einer RNA, insbesondere mRNA und ganz besonders Regulationselementen dieser, ist und durch Bindung an diese Bereiche eine Hemmung der Genexpression bewirkt. Die Anti-Sinn-RNA kann auch DNA-Sequenzen umfassen. Ferner kann die Anti-Sinn-RNA als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegen. Ein solcher Vektor kann

.

- 2 -

PCT/DE97/01691

ein üblicher Expressionsvektor sein. Günstig kann es sein, wenn die Expression der für die Anti-Sinn-RNA kodierenden Sequenz unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors, wie eines Gewebe- oder Tumor-spezifischen Promotors, steht.

5

10

15

20

WO 98/05770

Der Ausdruck "Sekundärstruktur" umfaßt jegliche DNA- und/oder RNA-Sequenz, die in einer Anti-Sinn-RNA vorliegen kann und eine zumindest teilweise "Hairpin"-Struktur aufweist, d.h. einzelne Basenpaare unterliegen einer Rückfaltung. Die Sekundärstruktur kann innerhalb der Anti-Sinn-RNA vorliegen. Auch kann sie am 5'- und/oder 3'-Ende der Anti-Sinn-RNA vorliegen. Liegen mehrere Sekundärstrukturen vor, können diese gleich oder verschieden voneinander sein. Vorzugsweise ist die Sekundärstruktur eine  $(GC)_n$ -Palindrom- $(GC)_n$ -,  $(AT)_n$ -Palindrom- $(AT)_n$ -, oder  $(CG)_n$ -Palindrom- $(CG)_n$ -Sequenz, wobei es besonders bevorzugt ist, wenn n=20 und das Palindrom eine EcoRl-Restriktionsstelle ist. Bevorzugt sind auch komplizierte Palindrome wie  $(AGCT)_n$  oder  $(GAATTC)_n$ .

Eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist es, durch Oligonukleotidsynthese eine doppelsträngige (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub>-Sequenz herzustellen und diese an das 5'-Ende der cDNA-Sequenz eines zu hemmenden Gens zu ligieren. Das erhaltene DNA-Molekül wird in 3'→ 5' Richtung an den Promotor eines Vektors ligiert. Der erhaltene Vektor führt zur Expression der erfindungsgemäßen Anti-Sinn-RNA. Ergänzend wird auf Sambrook, Fritsch, Maniatis, A Laboratory Mannual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, verwiesen.

25

30

Eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA kann als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors in Zellen eingebracht werden. Die Zellen können jegliche Zellen, wie Pflanzen- und tierische, insbesondere Säugetier- und ganz besonders menschliche Zellen, sein. Die Zellen können innerhalb eines Organismus oder außerhalb eines solchen vorliegen. Letztere können frisch isoliert oder in Kultur gehalten sein. Das Einbringen der Anti-Sinn-RNA in die Zellen kann durch übliche Transfektionstechniken, wie Elektroporation, erfolgen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Kombination aus einer erfindungsgemäßen Anti-Sinn-RNA und einer (ds)RNAse. Dies ist eine RNAse, die doppelsträngige RNA erkennen und abbauen kann. Eine (ds)RNAse findet sich z.B. in dem Hefestamm Schizosaccharomyces pombe (pac1+). In der Kombination kann die erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegen. Ebenso kann die (ds)RNAse als solche oder in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegen. Ein solcher Vektor kann ein üblicher Expressionsvektor sein. Günstig kann es sein, wenn die Expression der für die (ds)RNAse kodierenden Sequenz unter der Kontrolle eines konstitutiven oder induzierbaren Promotors, wie eines Gewebe- oder Tumor-spezifischen Promotors, steht. Ferner kann es von Vorteil sein, wenn die Kombination darin besteht, daß ein Vektor vorliegt, der sowohl für die erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA als auch für die (ds)RNAse kodiert. Hinsichtlich des Vektors wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

15

20

10

5

Die Kombination aus einer erfindungsgemäßen Anti-Sinn-RNA und einer (ds)RNAse kann in Zellen eingebracht werden. Hinsichtlich der Zellen und des Einbringens der Anti-Sinn-RNA wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Die (ds)RNAse kann als solche, d.h. als Protein, durch übliche Verfahren, wie Lipofektion, eingebracht werden. In Form eines sie kodierenden Vektors kann die (ds)RNAse durch Verfahren eingebracht werden, wie sie für die Anti-Sinn-RNA genannt wurden.

25

30

Die vorliegende Erfindung stellt eine Anti-Sinn-RNA und eine sie enthaltende Kombination bereit, die eine starke Hemmung der Genexpression bewirken. Die vorliegende Erfindung findet somit eine breite Anwendung in der Molekularbiologie und der Medizin. Insbesondere kann an die Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen gedacht werden, bei denen einzelne Proteine auslösend oder verstärkend sind. Dies sind z.B. Erkrankungen, bei denen Hormone eine große Rolle spielen, Tumorerkrankungen und virale Infektionen, wie HIV und AIDS.

5

15

20

25

### Kurze Beschreibung der Zeichnung

- Fig. 1 zeigt die Hemmung der Genexpression durch eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA. (1) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA. (2) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur I. (3) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur II.
- 10 Fig. 2 zeigt die Hemmung der Genexpression durch eine erfindungsgemäße Anti-Sinn-RNA. (1) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur I. (2) ist die Expressionsrate des CAT-Gens in Anwesenheit einer Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur I und einer (ds)RNAse.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung von Expressions-Vektoren, die das Chloramphenicolacetyltransferase (CAT)-Gen in 5'→ 3' bzw. 3'→ 5' Richtung enthalten.

Das CAT-Gen wurde aus einem üblichen CAT-Vektor isoliert und in die "multiple cloning site" des Expressionsvektors pJ3 $\Omega$  (vgl. Nucleic acids res. 18, (1990), 1068) inseriert. In einem Fall erfolgte die Insertion in 5' $\rightarrow$ 3' Richtung und es wurde der Expressionsvektor pJ3 $\Omega$ -CAT erhalten. Im anderen Fall erfolgte die Insertion in 3' $\rightarrow$ 5' Richtung und es wurde der Expressionsvektor pJ3 $\Omega$ -TAC erhalten.

WO 98/05770

5

- Beispiel 2: Herstellung von Expressionsvektoren, die das CAT-Gen in 3'→ 5' Richtung und eine für eine Sekundärstruktur I bzw. II kodierende Sequenz enthalten.
- 5 (A) Expressionsvektor mit einer (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub>-Sequenz am 5'-Ende des CAT-Gens (Sekundärstruktur I)
  - 1. Herstellung einer (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub>-Sequenz.

10 (a) Mittels eines automatischen Synthese-Geräts (Oligonukleotid-Synthesizer) wurden 2 Oligodesoxynukleotide hergestellt:

15

20

(b) Die beiden Oligodesoxynukleotide wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, auf 90°C erhitzt, danach langsam unter "annealing"-Bedingungen auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei entstand ein DNA Dopplestrang folgender Struktur:

25

(c) Unter Ligationsbedingungen entstanden Vielfache der in (b) beschriebenen DNA

30

(d) Die Ligationsprodukte wurden durch Gelelektrophorese nach

WO 98/05770

10

20

30

6

Größe aufgetrennt und eine Sequenz, bestehend aus Dimeren, wurde aus dem Gel eluiert und mittels Polynukleotidkinase /ATP phosphoryliert.

5 AATTC-(GC)<sub>20</sub>-GAATTC-(GC)<sub>20</sub>-G-P

\* \*\* +\*\*\*\* \*\* \*

P-G-(GC)<sub>20</sub>-CTTAAG-(GC)<sub>20</sub>-C

- (e) Diese Sequenz wurde zunächst in die EcoRI-Stelle des üblichen Klonierungsvektors pBluescript (Stratagene) eingesetzt, aus dem sie durch geeignete Restriktionsenzyme zur Umklonierung im den Vektor, der das CAT-Gen in 3'→ 5' Richtung aufweist, entnommen werden konnte.
- Einbau der (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>201</sub> Sequenz in den Vektor, der das CAT Gen in 3'→ 5' Richtung aufweist.

Der Vektor pJ3 $\Omega$ -TAC von Beispiel 1 wurde in der "multiple cloning site" zwischen dem Promotor und der TAC-Insertion mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten. Die  $(GC)_{20}$ -EcoRI- $(GC)_{20}$  Sequenz wurde mit den entsprechenden Enzymen aus dem pBluescript-Vektor von Beispiel 2(e) entnommen. Die beiden Nukleinsäuren wurden per Ligation verbunden. Es wurde der Expressionsvektor pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. I erhalten.

25 (B) Expressionsvektor mit einer (GC)<sub>20</sub>-EcoRI-(GC)<sub>20</sub>-Sequenz am 3'-Ende des CAT-Gens (Sekundärstruktur II).

Die unter Beispiel 2 (A) hergestellte (GC)<sub>20</sub>-EcoRl-(GC)<sub>20</sub>-Sequenz wurde in den Vektor pJ3Ω-TAC am 3'-Ende des TAC-Gens eingesetzt. Es wurde der Expressionsvektor pJ3Ω-TAC-Sek.II erhalten.

PCT/DE97/01691

- 7 -

# Beispiel 3: Herstellung eines Expressionsvektors, der für eine (ds) RNAse kodiert.

Aus einer üblichen genomischen Bibliothek von Schizosaccharomyces pombe wurde mittels einer PCR-Amplifikation das für eine (ds)RNAse kodierende Gen (pac1+) isoliert. Hierzu wurden Primer verwendet, die aus der bekannten Sequenz des Gens pac1+ (vgl. Datenbank: embl: S78982) abgeleitet worden waren. Das Gen pac1+ wurde in dem bekannten Vektor pBluescript kloniert und durch Sequenzierung bestätigt. Nach Umklonierung in den üblichen Expressionsvektor pcDNA3 (InVitrogen) wurde der Expressionsvektor pcDNA3-pac1+ erhalten.

# Beispiel 4: Hemmung der Genexpression durch eine Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur

(a) Ehrlich Ascites Tumorzellen (10<sup>7</sup> Zellen/ml) wurden mit den Expressionsvektoren pJ3Ω-CAT, pJ3Ω-TAC, pJ3Ω-TAC-Sek. I bzw. pJ3Ω-TAC-Sek. II transfiziert (vgl. Tabelle 1). Die Transfektion wurde mittels Elektroporation (366V/950μF/Elektrodenabstand D = 4mm) durchgeführt. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und Aliquote mit radioaktiv markiertem Chloramphenicol inkubiert. Es wurde die Konversionsrate (in Ac-, Di-Ac-Chloramphenicol) nach DC durch Messung der Radioaktivität bestimmt.

20

15

5

10

25

WO 98/05770	PCT/DE97/01691

- 8 -

#### Tabelle 1:

5

10

15

20

30

rapene r.	1	2	3
pJ3Ω-CAT	3 <i>µ</i> g	3 <i>µ</i> g	3 <i>µ</i> g
pJ3Ω-TAC	7,5 <i>µ</i> g	-	-
pJ3Ω-TAC-Sek. I	-	7,5µg	-
pJ3Ω-TAC-Sek. II	-	-	7,5µg

Aus Fig. 1 geht hervor, daß durch Transfektion von pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. I bzw. pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. II (vgl. Fig. 1, (2), (3) eine stärkere Hemmung der Expression des CAT-Gens erreicht werden kann, als wenn pJ3 $\Omega$ -TAC (vgl. Fig. 1, (1) verwendet wird.

(b) Ehrlich Ascites Tumorzellen (10<sup>7</sup> Zellen/ml) wurden mit den Expressionsvektoren pJ3Ω-CAT, pJ3Ω-TAC-Sek. I bzw. pcDNA3-pac1 + tranfiziert (vgl. Tabelle 2). Die Transfektionsbedingungen waren wie in Beispiel 4 (a) beschrieben.

### Tabelle 2:

		1	2
	pJ3Ω-CAT	5 <i>µ</i> g	5 <i>µ</i> g
25	pJ3Ω-TAC-Sek. I	10µg	10 <i>µ</i> g
	pcDNA3-pac1 +	-	10 <i>µ</i> g

Aus Fig. 2 geht hervor, daß durch Kotransfektion von pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. I mit pcDNA3-pac1 + (vgl. Fig. 2 (2)) eine stärkere Hemmung der Expression von CAT erhalten wird, als wenn pJ3 $\Omega$ -TAC-Sek. I (vgl. Fig. 2, (1) alleine verwendet wird.

Somit wird deutlich, daß eine Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur eine größere Hemmwirkung auf die Genexpression hat als eine Anti-Sinn-RNA ohne Sekundärstruktur. Ferner wird deutlich, daß die Hemmwirkung der Anti-Sinn-RNA mit Sekundärstruktur noch gesteigert werden kann, wenn zusätzlich zu gegebenenfalls natürlich vorhandenen (ds)RNAsen eine (ds)RNAse-Aktivität mittels der beschriebenen Verfahren hervorgerufen bzw. erzeugt wird.

5

5

10

#### Patentansprüche

- 1. Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen.
- 2. Anti-Sinn-RNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Sekundärstruktur am 5'- und/oder 3'-Ende der Anti-Sinn-RNA geschaffen worden ist.
- 3. Anti-Sinn-RNA nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Sekundärstruktur eine (GC)<sub>n</sub>-Palindrom-(GC)<sub>n</sub>- oder (CG)<sub>n</sub>-Palindrom-(CG)<sub>n</sub>- Sequenz ist.
- 4. Anti-Sinn-RNA nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß n = 20 und das Palindrom eine EcoRl-Restriktionsstelle ist.
- 5. Anti-Sinn-RNA nach einem der Ansprüche 1 4, dadurch gekennzeichnet,
   15 daß die Anti-Sinn-RNA durch einen Vektor kodiert ist.
  - 6. Kombination, umfassend die Anti-Sinn-RNA nach einem der Ansprüche 1-5 und eine (ds)RNAse.
- 7. Kombination nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Anti-Sinn-RNA und die (ds)RNAse durch einen oder mehrere Vektoren kodiert sind.
- 8. Verwendung der Anti-Sinn-RNA nach einem der Ansprüche 1-5 und der Kombination nach Anspruch 6 oder 7 zur Hemmung der Genexpression.



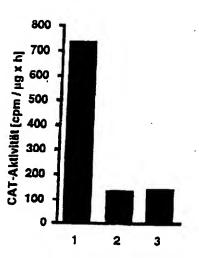


Fig. 1

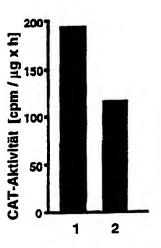


Fig. 2